

Compuestos fenólicos, actividad antioxidante y fotoprotectora *in vitro* de una crema gel elaborada con extracto estabilizado de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* HBK)

M. Inocente C.¹, G. Tomas Ch.², J. Huamán M.², M. Palomino P.³, P. Bonilla R.⁴

(Recibido: 21/10/2014 / Aceptado: 13/02/2015)

RESUMEN

Se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos de una crema gel elaborada con extracto estabilizado de los frutos de *Passiflora mollissima* HBK., con valores de $111,657 \pm 2,823$ mg de equivalentes de ácido gálico/100 mL muestra (método de Folin Ciocalteu), lo cual permitió establecer una relación con la actividad antioxidante con valores de $423,187 \pm 2,345$ μ mol Trolox/mL muestra (método DPPH) y valores de $0,774 \pm 0,0088$ mmol Trolox/mL muestra (método ABTS). Se obtuvieron valores de $11,754 \pm 0,241$ FPS (método *in vitro* de Mansur).

Palabras clave: *Passiflora mollissima*, tumbo serrano, antioxidante, fotoprotector, fenólicos.

Fenolic compounds, antioxidant activity and photoprotective *in vitro* of cream gel processed with extract stabilized of tumbo serrano (*Passiflora mollissima* HBK.)

ABSTRACT

Content of phenolic compounds in a cream gel made with stabilized extract of the fruits of *Passiflora mollissima* HBK., with values of $111,657 \pm 2,823$ mg equivalent gallic/100 mL sampling (Folin Ciocalteu) acid was quantified, which allowed to establish a relationship with antioxidant activity with values of $423,187 \pm 2,345$ μ mol Trolox/mL sampling (DPPH method) and values of $0,774 \pm 0,0088$ mmol Trolox/mL sampling (ABTS method). Were obtained FPS values of $11,754 \pm 0,241$ (*in vitro* method of Mansur).

Keywords: *Passiflora mollissima*, tumbo serrano, antioxidant, photoprotector, phenolic.

1. Maestría de Productos Naturales y Biocomercio, FFYB-UNMSM, minocente@farmaceuticos.com

2. Laboratorio de Productos Naturales, FQIQ-UNMSM, gtomasch@unmsm.edu.pe

3. Facultad de Medicina Humana-UNMSM, miriamp7@hotmail.com

4. Laboratorio de Química Orgánica, FFYB-UNMSM, pbonillae@unmsm.edu.pe

I. INTRODUCCIÓN

Se han desarrollado numerosos estudios sobre el efecto de los antioxidantes en la prevención del eritema cutáneo, aunque el espectro de acción de los antioxidantes se superpone con el espectro de acción de la radiación UVA (320-400 nm), por lo que la eficacia fotoprotectora de los mismos no solo será determinada por la protección frente al eritema fotoinducido, sino también por la protección sobre los daños moleculares y sobre el ADN derivados del estrés oxidativo generado por la radiación UV.^[1] La sensibilidad del mundo científico al daño generado por el estrés oxidativo en todos los ámbitos de la salud y el hecho de que la radiación ultravioleta sea el agente más eficaz en la producción de daño cutáneo por estrés oxidativo, hace que actualmente se esté en una búsqueda permanente de sustancias antioxidantes que actúen tanto por vía tópica como sistémica.^[2-4]

Los frutos de tumbo serrano destacan por su contenido en compuestos fenólicos.^[5,6] En este contexto, los frutos de *Passiflora mollissima* HBK representan una fuente vegetal con activos potenciales para ser usados como coadyuvante de los fotoprotectores solares, debido a su contenido de polifenoles.^[5]

En el Perú existen escasos estudios sobre productos naturales que se utilicen como fotoprotectores en formulaciones cosméticas. Debido a que el país tiene una extraordinaria variedad de recursos naturales, se debe aprovechar la oportunidad de desarrollar productos con valor agregado, que puedan brindar efectos benéficos o preventivos frente a enfermedades que puedan estar relacionadas con el exceso de exposición a la radiación solar.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Muestra

El fruto de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* HBK) fue colectado de la zona de “Juchanche”, en el distrito de San Lorenzo

de Quinti, provincia de Huarochirí, departamento de Lima, entre los 150 y 200 msnm; en enero del 2014.

Obtención y tratamiento del extracto

Los frutos fueron seleccionados para descartar la materia prima con putrefacción, partes blandas y contaminación visible. Estos fueron lavados y desinfectados. Luego, se realizó el pelado y licuado de los frutos con cubos de hielo (9:1). Se agrega una mezcla de agentes viscosantes (AYRUEXT22) con extracto de tumbo serrano (1:4), se deja reposar a 5°C por 1 hora. Finalmente, se licúa y filtra en una tela de nylon, eliminando las semillas.

Desarrollo de la crema gel^[7-8]

Se realizaron ensayos de formulaciones conteniendo el 15 % de extracto en el producto final. Así también, se ensayaron métodos de incorporación de los extractos. La tabla 1 muestra la composición final obtenida de la crema gel, así como el placebo utilizado.

Tabla 1. Composición cuali-cuantitativa.

CREMA GEL	PLACEBO
Extracto de tumbo serrano 15 %	Mezcla de agentes viscosantes 15%
Preservantes: Metilparabeno, Sorbato de potasio.	Preservantes: Metilparabeno, Sorbato de potasio.
Excipientes: Emulgade, Miristato de isopropilo, colágeno, CMC, propilenglicol, fragancia, agua.	Excipientes: Emulgade, Miristato de isopropilo, colágeno, CMC, propilenglicol, fragancia, agua.

Evaluación de la calidad

Análisis fisicoquímico: Se realizó el análisis fisicoquímico de la crema gel tomando en cuenta el aspecto, color y olor. Se determinó el pH y viscosidad.

Análisis microbiológico: El análisis microbiológico fue determinado siguiendo las especificaciones como límite máximo; en referencia a la Secretaría General de la

Comunidad Andina, según Resolución 1482, para productos comercializados en la Comunidad Andina. Se ha determinado cantidad de microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras; y ausencia de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Evaluación de la irritabilidad *in vitro*

La evaluación de la irritabilidad de la crema gel se desarrolló mediante el método *in vitro* HET CAM observacional o cualitativo según Laignier et al.^[9] e Inocente et al.^[10], y el método *in vitro* HET CAM TBS con el colorante Azul de Tripán, según protocolo INVITOX N° 108^[11] e Inocente et al.^[10]

Cuantificación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales fue determinado, acondicionando al método descrito por Muñoz et al (2007)^[5]. Se diluyó la crema gel, placebo y extracto en agua (1:10); se tomó una alícuota de 150 μ L (tres réplicas), en tubos de ensayo y se agregó 750 μ L de Folin-Ciocalteu; después de 5 minutos de reacción se añadió 600 μ L de carbonato de sodio al 7,5 %, se mezcló e incubó a 50°C/10 min; la absorbancia se obtuvo a 760 nm; en espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific). El resultado fue expresado como mg equivalentes de ácido gálico/100 mL de la muestra.

Evaluación de la actividad antioxidante (método DPPH)

Se determinó por el método espectrofotométrico frente al radical DPPH(2,2-difenil-1-picrilhidrazil) descrito por Inocente et al.^[12] Los resultados se expresan en μ mol de Trolox/mL de muestra. Fueron analizados estadísticamente mediante la prueba t-Student y ANOVA. Los valores con $p > 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El experimento se realizó por triplicado y los resultados expresados como valores promedio $\pm$ desviación estándar.

Evaluación de la actividad antioxidante (método ABTS)

Se determinó por el método espectrofotométrico frente al radical ABTS•+ ácido

2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) descrito por Inocente et al.^[12] Los resultados se expresan en mmol de Trolox/mL de muestra. Fueron analizados estadísticamente mediante la prueba t-Student y ANOVA. Los valores con $p > 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El experimento se realizó por triplicado y los resultados fueron expresados como valores promedio $\pm$ con desviación estándar.

Determinación *in vitro* del Factor de Protección Solar (FPS)

El factor de protección solar (FPS) de la crema gel, extracto y placebo elaborados se determinaron siguiendo la metodología *in vitro* descrita por Mansur et al.^[13] y ajustado para productos cosméticos por Inocente et al.^[12].

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del análisis fisicoquímico

Los resultados del pH de la crema gel (tabla 2), se encuentran en un rango de pH 5,0 a 7,0, lo cual indica que los productos se encuentran en condiciones favorables para la piel humana. Los resultados de la viscosidad demuestran la condición física de los productos, y se enmarcan a la estabilidad y consistencia.

Tabla 2. Análisis fisicoquímico de la crema gel

ANÁLISIS FISICOQUÍMICO	CREMA GEL
Aspecto	Homogénea
Color	Crema
Olor	Sui generis
pH (25°C)	5,72
Viscosidad cps (25°C)	3457,50

Del análisis microbiológico

Los resultados correspondientes a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, expresaron AUSENCIA de estos microorganismos; lo

cual indica que se ha elaborado el producto en condiciones sanitarias óptimas. El límite máximo permitido para los aerobios mesófilos, mohos y levaduras es $\leq 50 \times 10^2$ ufc/g. En la tabla 3 se observa que la crema gel cumple con las especificaciones.

Tabla 3. Análisis microbiológico de la crema gel.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	RESULTADO
Numeración de aerobios mesófilos ufc/g	< 10
Numeración de mohos ufc/g	< 10
Numeración de levaduras, ufc/g	< 10
Presencia de <i>S. aureus</i> /g	AUSENTE
Presencia de <i>P. aeruginosa</i> /g	AUSENTE
Presencia de <i>E. coli</i> /g	AUSENTE

De la evaluación de la irritabilidad *in vitro* (HET CAM observacional)

El índice de irritación obtenido para la crema gel clasifica como NO IRRITANTE, pero los controles de hidróxido de sodio (NaOH)

y laurilsulfato de sodio (LSS) resultan ser clasificados como IRRITANTES SEVEROS, según la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la prueba HET CAM, método observacional.

PRODUCTO	H *	L *	C *	I.I
CREMA GEL	>300	>300	>300	0
NaOH (control)	135	12	14	18,14
LSS (control)	>300	17	96	12,78

*Resultados expresados en segundos

H: Hemorragia L: Lisis C: Coagulación

I.I.: Índice de Irritación

De la evaluación de la irritabilidad *in vitro* (HET CAM TBS)

Según el método, la crema gel clasificó como NO IRRITANTE en comparación con los controles positivos de laurilsulfato de sodio 1%, hidróxido de sodio 0,1 N que clasificaron como IRRITANTE MODERADO e IRRITANTE SEVERO, respectivamente (tabla 5 y gráfico 1).

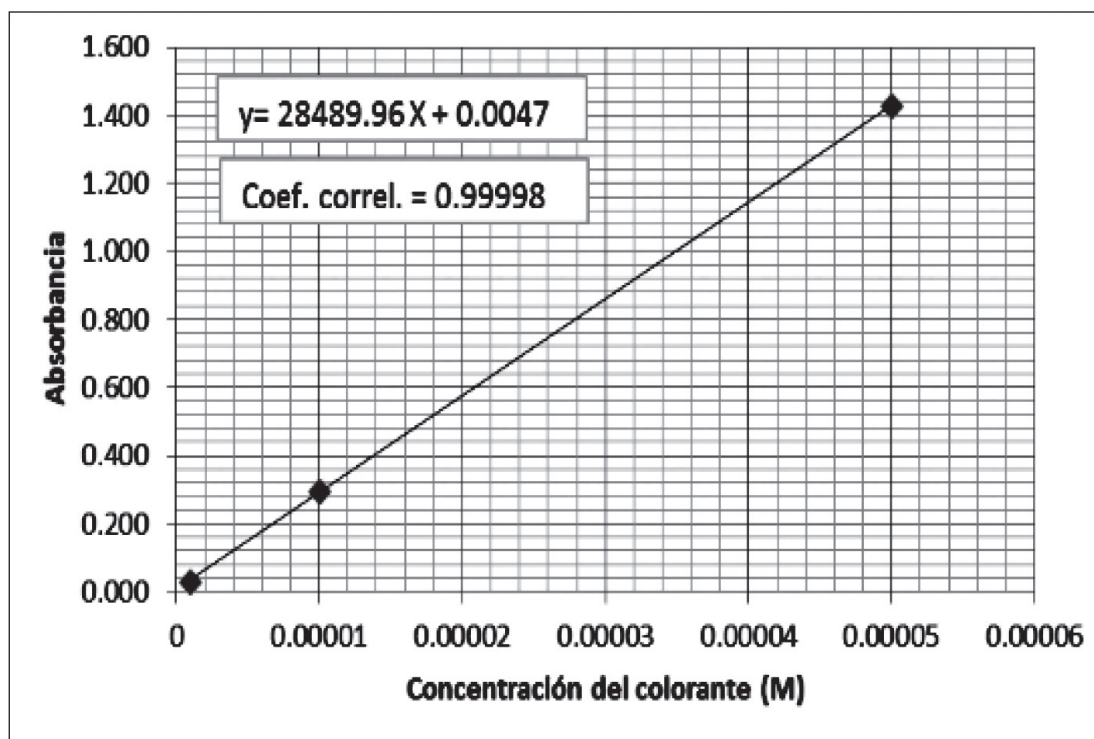


Gráfico 1. Curva de calibración del colorante azul de Tripán en formamida.

Tabla 5. Resultados del test de HET CAM con el colorante azul de Tripán.

PRODUCTO	ABS.	PESO membrana (mg)	Conc. colorante Moles/mg	Colorante absorbido *
CREMA	0,018	63,50	$4,550 \times 10^{-7}$	$0,036 \pm 0,004$
Suero fisiológico	0,023	44,80	$6,422 \times 10^{-7}$	$0,072 \pm 0,000$
NaOH 0,1 N	0,274	97,50	$9,452 \times 10^{-6}$	$0,494 \pm 0,082$
LSS 1%	0,058	60,90	$1,853 \times 10^{-6}$	$0,155 \pm 0,034$

* Resultados expresados en Promedio $\pm$ DS

De la cuantificación de polifenoles totales

La crema gel presenta $111,65 \pm 2,823$ mg equivalente de ácido gálico/100 mL muestra, en comparación con el extracto de $579,324 \pm 3,02$ mg equivalente de ácido gálico/100 mL muestra, (gráfico 2).

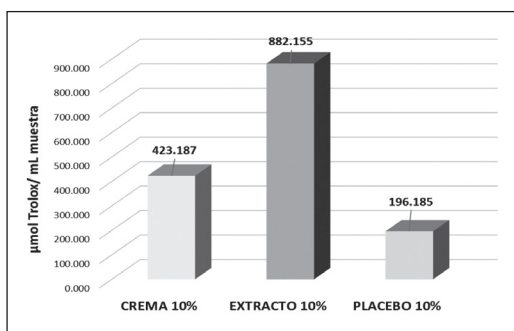


Gráfico 2. Cuantificación de polifenoles totales.

De la actividad antioxidante

De acuerdo al método DPPH, se obtuvieron valores de $423,187 \pm 2,345$ μmol Trolox/mL muestra en comparación con el extracto con $882,155 \pm 4,690$ μmol Trolox/mL muestra, (gráfico 3).

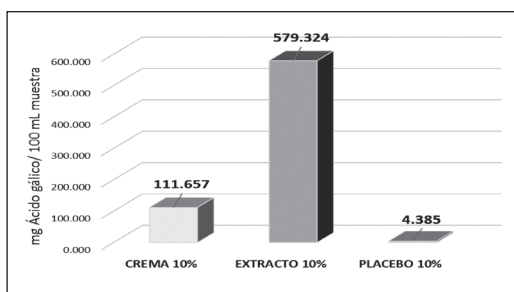


Gráfico 3. Capacidad antioxidante (método DPPH)

De acuerdo al método ABTS, se obtuvieron valores de $0,774 \pm 0,0088$ mmol Trolox/mL muestra para la crema gel 10% en compa-

ración con el extracto con $1,303 \pm 0,0079$ mmol Trolox/mL muestra, (gráfico 4).

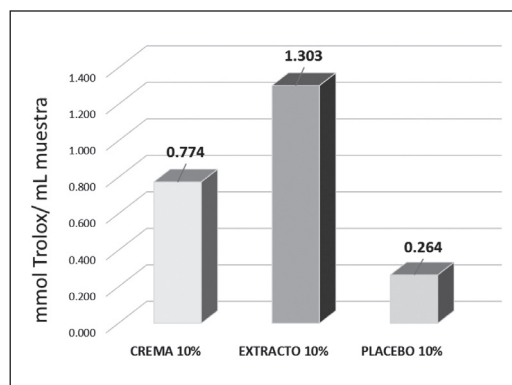


Gráfico 4. Capacidad antioxidante (método ABTS).

Determinación del FPS de la crema

El fruto de tumbo serrano (*Passiflora molli-sima HBK*) brinda una excelente alternativa para ser utilizado como fotoprotector en formulaciones cosméticas por poseer en su composición compuestos con actividad biológica, los que resaltan sustancias antioxidantes, como compuestos fenólicos y betacarotenos^[5, 14].

Se obtuvieron valores de FPS de $11,754 \pm 0,241$ para la crema gel y $21,820 \pm 0,298$ para el extracto, (gráfico 5).

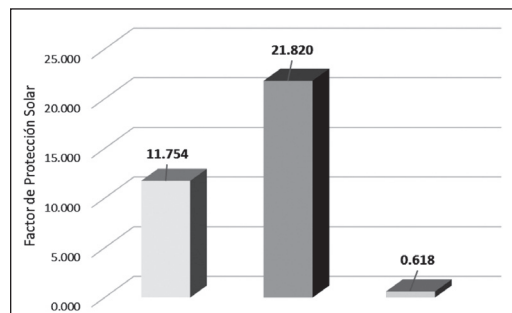


Gráfico 5. Valores de FPS en la crema gel.

La actividad fotoprotectora de una formulación no solo se debe a los filtros (sintéticos o naturales) que puedan estar presentes; si no también los excipientes pueden aportar un efecto fotoprotector a la fórmula, ya que algunos de ellos absorben radiación en el rango UV^[15]. Con estas consideraciones se estableció utilizar una misma base para la formulación y placebo, para poder comparar los resultados de FPS, así también los espectros de los mismos.

Por razones económicas, prácticas y éticas, se adoptó un método *in vitro* para la determinación del FPS. Este método es seguro y posee buena correlación con resultados obtenidos *in vitro* en estudios previos^[16].

Se determinó el SPF *in vitro* de la crema gel por el método de Mansur et al^[13]. El presente estudio evalúa el SPF de fotoprotectores en el rango de 290 a 320 nm (rango UVB), mas no en el rango UVA ni UVC, debido a que el método descrito de Manzur no abarca todo el rango ultravioleta (200 a 400 nm); sin embargo, cabe mencionar que en Australia, las autoridades competentes en la materia han desarrollado un método fotométrico, más conocido como método australiano (SAA) para efectuar un cálculo estimado del SPF frente a la radiación UVA.^[16]

Se realizaron diluciones de la crema gel en etanol absoluto hasta obtener la concentración de 0,2 mg/mL. Las diluciones fueron sometidas a análisis espectrofotométrico en las longitudes de onda de 290, 295, 300, 305, 310, 315 y 320nm. Los valores obtenidos se utilizaron en la ecuación elaborada por Mansur^[13]. Este método mostró ser rápido, de fácil ejecución y con resultados de baja desviación estándar.

Tomando como referencia el reglamento Técnico Mercosur sobre protectores solares en cosméticos^[17], se establece que una formulación debe tener valores de SPF 6 como mínimo para ser considerado fotoprotector. Por tanto, las formulaciones elaboradas con extracto de tumbo serrano estarían consideradas dentro de este grupo. El extracto de

tumbo serrano ha mostrado un mayor SPF relacionado con la cantidad de compuestos fenólicos presentes, lo cual justifica su inclusión en productos fotoprotectores.

IV. CONCLUSIONES

Se estableció parámetros de la calidad fisicoquímica, microbiológica y seguridad (irritabilidad) de la crema gel con extracto estabilizado de tumbo serrano. La crema gel contiene compuestos fenólicos con valor de $111,657 \pm 2,823$ mg equivalente de ácido gálico/100 mL muestra y denota actividad antioxidante con valores de $423,187 \pm 2,345$ μ mol Trolox/mL muestra (método DPPH) y $0,774 \pm 0,0088$ mmol Trolox/mL muestra (método ABTS). La crema gel denota valores de factores de protección solar (FPS) de $11,754 \pm 0,241$. Se concluye que la crema gel posee propiedades antioxidantes y factor de protección solar acorde a las exigencias normativas.

V. AGRADECIMIENTO

Esta investigación se ha realizado gracias al financiamiento del CONCYTEC- Beca de Maestría y financiamiento propio de los investigadores. AYRU COSMETIC SAC por brindar las instalaciones para el desarrollo de las formulaciones. A la señora Yrma Zárate por su apoyo.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] De Gálvez M.V. Antioxidantes en fotoprotección, ¿realmente funcionan?. Actas Dermo- sifiliográficas. 2010;101(3): 197-200.
- [2] Vile G.F., Tyrell R.M. UVA radiation induced oxidative damage to lipids and proteins *in vitro* and in humanskin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen. Free Radic. Biol. Med. 1995; 18:721-30.
- [3] Jaruga P., Dizdaroglu M. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. Nucleic Acids Res. 1996; 24:1389-94.

- [4] Applegate L.A., Frenk E. Oxidative defense in cultured human skin fibroblasts and keratinocytes from sun-exposed and non exposed skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1995; 11:95-101.
- [5] Muñoz A.J., Ramos F.E., Alvarado C.O., Castañeda B.C. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Quím.* 2007; 73 (3): 142-149.
- [6] Sánchez N.Y., Sepúlveda J.U., Rojano B.A. Desarrollo de una bebida láctea con extractos de curuba (*Passiflora mollissima* Bailey) como antioxidante natural. *Rev. Bio. Agro.* 2013; 11(1): 164-173.
- [7] Alcalde T. Alimentos Usados en Formulaciones Cosméticas. *Propiedades y Aplicaciones.* Offarm. 2007; 26 (1): 100-108.
- [8] Villarreal A. Formulación de una nano-emulsión dermocosmética, nutritiva y regeneradora de la piel. [Tesis Maestría]. Venezuela: Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes; 2004.
- [9] Laignier E., Chiva F., Másquilo F., Dafflon M., Nunes H. Corrositex, BCOP and HET CAM as alternative methods to animal experimentation. *Braz. J. of Pharm. Sc.* 2009; 45(4): 759-766.
- [10] Inocente C.M., Toscano G.E., Castañeda C.B. Efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extractos de camu camu, mediante el método HET CAM. *Horiz. Med.* 2013; 13 (2): 12-18.
- [11] INVITOX. Protocol Number 108. CAM-TBS test. European Center for the Validation of Alternative Methods ECVAM. 1996.
- [12] Inocente C.M., Tomas G., Huamán M.J., Muñoz J.A., et al. Actividad antioxidante y fotoprotectora *in vitro* de una loción y gel elaborados con extracto estabilizado de camu camu (*Myrciaria dubia* Kunth). *Rev. Soc. Quím. Perú,* 2014; 80(1): 65-77.
- [13] Mansur J., Breder M., Mansur M., Azulay R. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol.* 1986; 61 (1): 121-124.
- [14] Contreras C.J., Calderón J.L., Guerra H.E., García V.B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International.* 2011; 44: 2047-2053.
- [15] Brotto L. A química dos protetores solares. VIII SIMPEQ. 2008.
- [16] Wang S., Balagula Y., Osterwalder U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. *Dermatol. Ther.* 2010; 23 (1): 31-47.
- [17] Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento técnico MERCOSUL sobre protetores solares em cosméticos. Resolução - RDC Nº 30 de 1º de junho de 2012.

